

По современным представлениям, в основе «истинной» сосудистой ТН лежат патологические процессы на клеточном уровне с увеличением чувствительности артерий к вазоконстрикции при повышенной продукции в сосудистой стенке супероксида. Вазомоторная функция сосудов зависит как от эндотелия, так и от сохранности миогенной гуанилатциклазы. Нарушение процессов вазодилатации в ответ на экзогенно введенный оксид азота происходит при повреждении гуанилатциклазного механизма в гладкомышечных клетках сосудистой стенки. По литературным данным, при изучении биологических аспектов сосудистой толерантности к нитратам была обнаружена тесная корреляция между накоплением цГМФ в гладкомышечных клетках коронарных артерий и уровнем NO при биотрансформации экзогенных нитратов (2). Вышесказанное согласуется с полученными в настоящем исследовании данными. Для состояния ТН у больных ИБС помимо других механизмов характерна и интенсификация процессов ПОЛ на фоне снижения активности антиоксидантной защиты крови. В результате этого нарушается процесс биотрансформации оксида азота. В исследовании показано, что в конечном итоге при ТН происходит нарушение гуанилатциклазного механизма в гладкомышечных клетках, следствием чего является вазомоторная недостаточность.

Литература

1. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis/D.S. Celermajer, K.E. Sorensen, V.W. Gooch e. a.// Lancet.-1992.-Vol.340.-P.111-115.
2. Ignarro L.Y, Lipton H., Edwards J.C. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitroprusside and nitric oxide: evidence for involvement of S-nitrosothiols as active intermediates// J. Pharmacol Exp. Ther.-1981.-Vol.218.-P.739-749.

ТЕСТ-СИСТЕМА РИА ¹²⁵I-цГМФ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

**Михайлопуло И.А., *Силивончик Н.Н., Шуляковская С.М.,
Макаренко М.В., *Кухтик О.В.**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск,
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Действие ряда вазоактивных веществ, синтезируемых и секретируемых эндотелием, опосредовано через систему циклических нуклеотидов, в частности, 3',5'-циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ,

1). Это позволяет предполагать, что определение содержания данного соединения в плазме и форменных элементах крови, а также соотношение цАМФ/цГМФ может оказаться эффективным показателем оценки функционального состояния эндотелия при гемодинамических расстройствах у больных гепатологического профиля, в частности, при циррозе печени. Методы определения уровня 3',5'-цГМФ, основанные на непосредственной активации циклическим ГМФ фосфорилазы [1] и методы, основанные на активации цГМФ-зависимых протеинкиназ [2], метод сатурационного анализа имеют невысокую чувствительность, достаточно трудоемки и малотехнологичны. Наиболее удобный метод определения 3',5'- цГМФ в биологических объектах - радиоиммунологический анализ, позволяющий детектировать данные соединения во внутриклеточных концентрациях (10^{-8} - 10^{-12} М).

Материалы и методы исследований

Нами разработана система радиоиммунологического анализа для определения 3',5'-цГМФ с использованием иммуногенного (3) и радиоактивно меченого (4) конъюгатов на основе 2'-0-сукцинил-цГМФ (2). Синтез данных соединений описан ранее [3].

Антисыворотку к цГМФ получают путем иммунизации животных (взрослых особей кроликов породы Шиншилла весом 2,0-2,5 кг). Животным вводят подкожно в 5-6 точек спины эмульсию, состоящую из 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда, 0,25 мл физиологического раствора и 0,25 мг конъюгата 3 (в расчете на одного кролика). Повторное введение эмульсии того же состава проводят 6 раз с интервалом в 2 недели, а затем - через месяц до получения антисывороток с высокими титрами. Процесс иммунизации продолжают 6 месяцев. Контроль за динамикой выработки антител позволяет отобрать животных, у которых титр антисыворотки превышал 1:15000. Выделение антител проводят по методике, описанной ранее [3].

Результаты и их обсуждение

Специфичность определения цГМФ является одним из ключевых параметров антисыворотки, так как в аналитической пробе, как правило, содержатся близкие по структуре соединения в концентрациях, значительно превышающих уровень цГМФ.

Специфичность антисывороток оценивали посредством измерения степени перекрестной реакции различных кроссреагентов относительно цГМФ. В экспериментах сравнивали количество вещества, ингибирующего связывание антисыворотками радиоактивно меченого аналога цГМФ на 50% с количеством немеченого соединения, которое оказывает такой же эффект. Количественной оценкой эффективности связывания аналога с антителами служила величина ID_{50} (рис. 1).

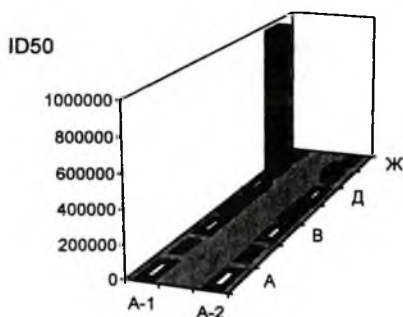
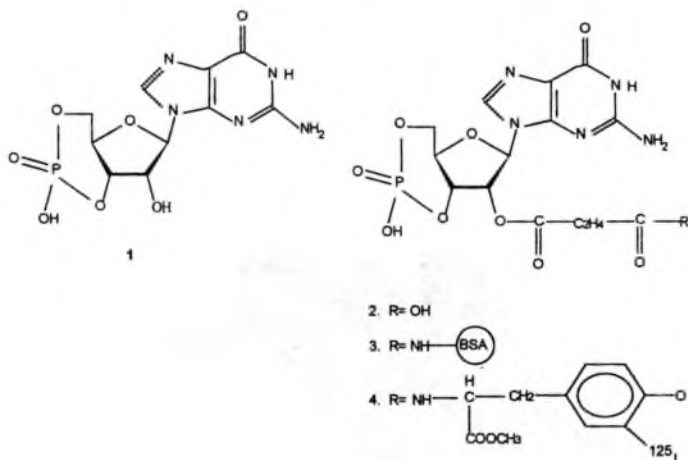


Рис. 1. Гистограмма взаимодействия антисывороток А-1 и А-2 с цГМФ и родственными соединениями.

А - 3',5'- цГМФ; Б - 3',5'- цАМФ; В - 2',3' - цГМФ; Г - 5' - ГМФ; Д - ГДФ; Е - ГТФ; Ж - теofilлин.

При выборе веществ для оценки специфичности антисывороток мы ориентировались на данные, приведенные в оригинальных публикациях. Коэффициент вариации результатов определений ($n=10$) концентрации цГМФ в образцах плазмы крови и мочи с низким, средним и высоким содержанием цГМФ с использованием тест-системы не превышает 10%.

Используя разработанную тест-систему РИА ^{125}I -цГМФ и РИА ^{125}I -цАМФ, было определено содержание циклических нуклеотидов у 54

больных циррозом печени различной этиологии и 30 доноров. Класс тяжести цирроза (по Child-Pugh) у 5 - А, 27 - В, 22 - С. Асцит имел место у 45 больных. Содержание цАМФ у больных циррозом печени достоверно не отличалось от показателей доноров, хотя у отдельных пациентов зарегистрированы низкие его значения (рис.2). Уровень цГМФ у больных циррозом был достоверно выше по сравнению с донорами ($2,25 \pm 0,47$) пмоль/мл - как в группе без асцита ($5,03 \pm 1,12$, $P < 0,05$), так и с асцитом ($3,93 \pm 0,70$, $P < 0,05$).

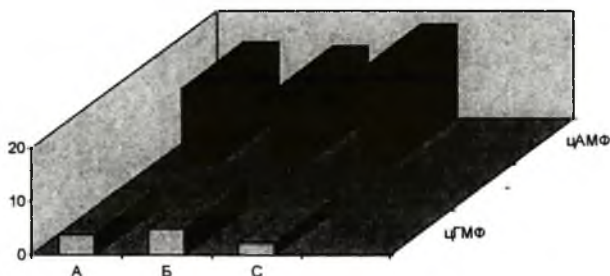


Рис 2. Содержание циклических нуклеотидов в плазме больных циррозом печени с асцитом (А), без асцита (Б) и в контрольной группе (С).

Полученные данные позволяют сделать предположение об участии цГМФ в формировании гемодинамических расстройств, которые, по современным представлениям, лежат в основе механизмов развития и поддержания асцита, а также гепато-ренального синдрома у больных циррозом печени.

Литература

1. Xu Y., Liu J., Yu C. Quantitative analysis of cAMP and cGMP in the plasma, iris and aqueous humor in rabbits with high intraocular pressure // *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih.*- 1997.- Vol. 33, N 6.- P. 433-435.
2. Yoshioka A., Yamaya Y., Saiki S. et al. Cyclic GMP/cyclic GMP-dependent protein kinase system prevents excitotoxicity in an immortalized oligodendroglial cell line // *J. Neurochem.*- 2000.- Vol. 74, N 2.- P. 633-640.
3. Steiner A.L., Pagliara A.S., Chase L.R., Kipnis D.M. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'- monophosphate in mammalian tissues and body fluids // *J. Biol. Chem.* - 1972.- Vol. 247.- P. 1114-1120.